

Penelitian

Kompetensi Maturasi Oosit *in vitro* dan Kajian Histologi Folikel dari Ovarium Domba Pascapenyimpanan pada Suhu 4 °C

(*In Vitro* Maturation Competence of Oocyte and Histology Observation of Follicle after Storage of Sheep Ovary at 4°C)

Masturi Muhajir¹, Ni Wayan Kurniani Karja^{2*}, Mohamad Agus Setiadi², I Ketut Mudite Adnyane³

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Bagian Anatomi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

*Penulis untuk korespondensi: karja_nwk13@gmail.com

Diterima 15 Agustus 2017, Disetujui 13 Maret 2018

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kompetensi maturasi oosit secara *in vitro* dan gambaran histologi ovarium pascapenyimpanan ovarium pada suhu 4 °C selama empat hari. Ovarium dari rumah potong hewan dibagi menjadi 4 kelompok dan disimpan pada suhu 4°C selama 0 jam (kelompok H-0/kontrol), 24 jam (Kelompok H-1), 48 jam (Kelompok H-2), 72 jam (Kelompok H-3) dan 96 jam (Kelompok H-4). Pada setiap akhir periode penyimpanan, oosit dikoleksi dan diseleksi berdasarkan keadaan kekompakan sel-sel kumulus, kehomogenan dari sitoplasma (*Grade* A sampai C). Oosit dengan *grade* A dan B dimaturasi secara *in vitro* selama 24 jam. Gambaran folikel dalam ovarium pascapenyimpanan dikaji dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Terjadi penurunan yang signifikan ($P<0.05$) pada jumlah oosit dengan *grade* A setelah hari kedua penyimpanan. Kemampuan oosit untuk mencapai MII menurun setelah penyimpanan hari kedua ($P<0.05$). Seiring dengan penurunan jumlah oosit yang mencapai MII, terjadi peningkatan jumlah oosit yang mengalami degenerasi pada hari ketiga dan keempat pascapenyimpanan ovarium ($P<0.05$). Dari gambaran histologi, ditemukan adanya folikel yang mengalami piknotik setelah penyimpanan 24 jam. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kualitas oosit persentase oosit mencapai MII menurun setelah penyimpanan 24 jam. Terjadi perubahan struktur sel dan degenerasi dari oosit pada gambaran histologi folikel dalam ovarium.

Kata kunci: domba, histologi, maturasi *in vitro*, ovarium, preservasi 4 °C

ABSTRACT

The objective of this study were to observe the *in vitro* maturation competence of oocyte and histology observation of follicle of sheep ovaries after Storage at 4°C. The ovary was collected from local slaughter house and then were stored at 4°C for 0 h (H-0/control group), 24 h (H-1 group), 48 h (H-2 group), 72 h (H-3 group), or 96 h (H-4 group). At the end of storage period, oocytes were collected and classified according to number of cumulus cell and homogeneity of cytoplasm (*Grade* A to C). Oocytes in *Grade* A and B were matured *in vitro* for 24 h. Histology of follicle were observed by Hematoxylin-Eosin (HE). The number of oocytes in *Grade* A and the maturation competency of oocytes were decreased after Day 2 of ovary storage ($P<0.05$). Whereas, the number of degenerative oocytes increased after day 3 of ovary storage. The incidence of picnotic in follicle was found during 48 hours storage. In conclusion, oocyte quality and maturation competency of oocytes *in vitro* decreased as long as prolonged of period storage. There was found the degeneration of oocytes and cumulus cell started at day 2 of ovarian storage.

Keywords: sheep, histology, *In vitro* Maturation, Ovaries, 4 °C preservation

PENDAHULUAN

Teknologi reproduksi berbantuan seperti produksi embrio secara *in vitro*, embrio transfer dan embrio kriopreservasi dapat menjadi suatu sistem untuk mempertahankan keberadaan suatu spesies hewan terutama yang hampir mengalami kepunahan (Swason, 2006). Perkembangan sistem *in vitro maturation* (IVM) dan *in vitro fertilization* (IVF) yang baik akan menyediakan satu pendekatan untuk usaha penyelamatan materi genetik bagi hewan dengan genetik unggul atau hewan hampir punah yang mati tiba-tiba (Chohan & Hunter, 2003). Namun demikian, usaha tersebut memerlukan teknik koleksi dan preservasi yang tepat karena prosedur yang digunakan untuk memproses ovarium dan oosit yang ada di dalamnya dapat mempengaruhi tingkat maturasi dan perkembangan embrio selanjutnya. Oosit yang terdapat di dalam folikel harus dipertahankan viabilitasnya sampai dapat dikoleksi dan ditempatkan pada kondisi kultur yang sesuai. Jika oosit intra-ovarian ini mampu dipertahankan viabilitasnya selama periode tertentu sehingga dapat mendukung keberhasilan IVM/IVF, maka prosedur tersebut memberi kemungkinan untuk digunakan dalam menyelamatkan materi genetik atau gen dari hewan post-mortem. Namun, pada kondisi dimana ovarium tidak dapat segera diproses karena jauh dari laboratorium, perlu adanya sistem preservasi ovarium untuk menjaga viabilitas oosit yang ada di dalam folikel tersebut (Hanna et al., 2008; Evecen et al., 2009). Oleh karena itu, penanganan ovarium selama transportasi dari lapangan ke laboratorium menjadi perhatian utama (Silva et al., 2000).

Penyimpanan ovarium pada suhu yang tepat sebelum dapat diproses akan menghasilkan oosit yang mampu berkembang dengan baik secara *in vitro*. Secara umum, penyimpanan oosit mamalia pada suhu di bawah suhu fisiologis hewan diketahui dapat mempengaruhi viabilitas dan menginduksi terjadinya abnormalitas oosit yang bervariasi pada semua fase meiosis (Moor & Crosby, 1985; Pickering et al., 1990; Aman & Parks, 1994; Luu et al., 2014). Pada babi, oosit yang dikoleksi dari ovarium setelah disimpan pada suhu 15°C atau lebih rendah, selama 6 jam tidak mampu untuk mencapai fase *metaphase II* (MII) (Wongsrikeao et al., 2005). Namun pada sapi, oosit yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu 4°C atau 10°C selama 24 jam tidak menunjukkan penurunan yang nyata terhadap kemampuan oosit untuk berkembang secara *in vitro* (Matsushita et al., 2004). Oosit kucing yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu 4°C selama 72 jam masih menunjukkan kemampuan untuk

berkembang secara *in vitro* (Wolfe & Wildt, 1996). Pada penelitian Febretrisiana et al. (2015) penyimpanan oosit domba pada suhu 4°C selama 8-10 jam meunjukkan tingkat maturasi oosit yang lebih tinggi dibandingkan dengan 2 kelompok penyimpanan suhu lainnya yaitu 36-37°C dan 27-28°C. Naoi et al. (2007) melaporkan bahwa kualitas dan perkembangan oosit dipengaruhi oleh periode penyimpanan ovarium pada suhu ruang sebelum kemudian disimpan pada suhu 4°C. Hal tersebut di atas mengindikasikan bahwa periode dan suhu penyimpanan ovarium setelah kematian hewan sangat berpengaruh terhadap potensi perkembangan oosit selanjutnya dan bersifat spesifik terhadap jenis spesies, sehingga penelitian ini bertujuan mengetahui kompetensi maturasi *in vitro* oosit dan kajian mikroskopis ovarium domba pascapenyimpanan ovarium pada suhu 4°C.

BAHAN DAN METODE

Koleksi dan Pematangan Oosit

Ovarium yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) domba, kampung Cikanyong, desa Citaringgul, Kecamatan Babakan Madang, Kabupaten Bogor. Ovarium kemudian dibagi secara acak menjadi 4 kelompok: kelompok kontrol (H-0) yaitu ovarium ditempatkan di dalam plastik ziplock yang berisi larutan fisiologis 0,9% dengan campuran *penicilin* 100 IU/l + *streptomycin* 0,1 g/l pada suhu 34-36°C kemudian memasukkannya ke dalam termos, ovarium yang lainnya dimasukkan ke dalam plastik yang berisi larutan fisiologis 0,9% dengan campuran *penicilin* 100 IU/l + *streptomycin* 0,1 g/l dan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam (Kelompok H-1), 48 jam (Kelompok H-2), 72 jam (Kelompok H-3) dan 96 jam (Kelompok H4). Pada setiap akhir periode penyimpanan, oosit dikoleksi dengan cara pencacahan (*slicing*) dengan menggunakan pisau scalpel pada cawan petri steril yang berisi *phosphate buffered saline* (PBS) 10% yang ditambahkan dengan 0,3% *bovine serum albumin* (BSA), 100 IU/ml *penicilin* dan 0,1 g/ml *streptomycin*. Selanjutnya oosit dikoleksi berdasarkan keadaan kekompakan sel-sel kumulus, kehomogenan dari sitoplasma dan dipisahkan berdasarkan grade oosit yaitu grade A: oosit dikelilingi lebih dari 3 lapis sel granulosa dan kumulus kompak dengan sitoplasma yang homogen, grade B: dikelilingi kurang dari 3 lapis sel granulosa dan kumulus yang kompak dengan sitoplasma yang homogen, grade C: oosit dikelilingi tanpa atau sedikit sel granulosa dan sel kumulus dengan sitoplasma

yang sudah tidak homogen, dan oosit yang sudah mengalami degenerasi/fragmentasi (Gordon, 2003)

Oosit dengan grade A dan B kemudian dicuci sebanyak dua kali dengan medium maturasi dan dimaturasi pada incubator 5% CO₂, pada temperatur 38,5°C selama 24 jam (Safitri et al., 2017). Media maturasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tissue culture medium (TCM) yang ditambahkan pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 10 IU/ml, human chorionic gonadotrophin (hCG) 10 IU/ml, gentamycin 50 µg/ml dan bovine serum albumin 0,3% (Karja et al., 2013).

Evaluasi Tingkat Kematangan Oosit In Vitro

Oosit yang telah dimaturasi dihilangkan sel kumulus (denudasi) dengan melakukan pemipetan secara berulang dengan bantuan enzim hyaluronidase 0,25%. Kemudian oosit diletakkan di atas drop KCl di atas objek glass kemudian difiksir dengan cara ditutup cover glass yang memiliki bantalan vaselin pada kedua pinggiran cover glass. Preparat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam wadah larutan fiksasi asam asetat dan etanol (1:3) selama 2-3 hari. Preparat yang telah difiksasi selanjutnya diwarnai dengan menggunakan aceto-orcein 2% selama 5 menit. Kemudian zat pewarna dibersihkan dengan menggunakan asam asetat 25% dan ke-empat sisi cover glass diberi kuteks bening dan selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dengan mikroskop fase kontras (olympus IX 70, Japan).

Evaluasi tingkat kematangan inti dinilai dengan menghitung jumlah oosit pada setiap tahap pembelahan meiosis. Status inti oosit dikelompokkan menjadi tahap germinal vesicle (GV), metaphase I (MI), dan metaphase II (MII). Germinal vesicle ditandai dengan membran inti yang masih menyatu dengan vesicle, sedangkan MI ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet dibidang ekuator, anaphase I (AI) ditandai dengan perpindahan kromosom ke arah kutub, telophase I (TI) ditandai dengan kromosom telah mencapai dua daerah kutub serta MII ditandai dengan adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap MII. Oosit dikategorikan sebagai oosit yang telah matang jika telah berada pada tahap metaphase II.

Kajian Histologi Folikel Pascapenyimpanan Ovarium Pada Suhu 4°C

Sampel ovarium pascapenyimpanan dicuci dengan NaCl fisiologi 0.9%, lalu dimasukkan dalam larutan fiksatif Paraformaldehide 4% selama 5 hari. Selanjutnya jaringan diproses dehidrasi, clearing dan

embedding. Proses dehidrasi dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam seri larutan konsentrasi bertingkat (alkohol 70%, 80%, 90% dan 95%), masing-masing selama 24 jam. Setelah itu jaringan dipindahkan ke dalam larutan alkohol absolut I, II, III, masing-masing selama 1 jam. Proses clearing dilakukan dengan memasukkan sampel jaringan ke dalam xylol I, II, III masing-masing selama 30 menit (pada xylol III: 15 menit pada suhu ruang dan 15 dalam inkubator). Selanjutnya sampel organ ovarium dimasukkan ke dalam parafin cair I, II, dan III. Proses selanjutnya dilakukan penanaman sampel ke dalam parafin (embedding) menggunakan alat tissue embedding console. Hasil berupa blok parafin dilekatkan pada balok kayu sebelum dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom. Organ yang berada di dalam blok parafin dipotong dengan mikrotom pada ketebalan 5 µm. Hasil pemotongan kemudian dilekatkan pada gelas obyek, dipanaskan di atas hotplate dan selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 hari, sebelum dilakukan proses pewarnaan (Kiernan 1990; Bancroft dan Gamble 2008).

Hasil potongan sampel jaringan diwarnai dengan hematoksin-eosin (HE) untuk melihat struktur ovarium secara mikroskopis. Sampel hasil potongan dicelupkan dalam larutan xylol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan proses rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi yang lebih rendah (alkohol absolut I, absolut II, absolut III, alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%) masing-masing selama 3 menit. Proses dilanjutkan dengan perendaman jaringan dalam akuades selama 15 menit. Jaringan kemudian diwarnai dengan hematoksin selama 3 menit, lalu dicuci dengan air kran selama 5 menit lalu dipindahkan ke dalam akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan eosin selama 5 menit lalu dibilas menggunakan akuades. Pemucatan warna sekaligus dehidrasi dilakukan dengan mencelupkan beberapa detik dalam larutan seri alkohol 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, absolut II dan III. Proses penjernihan (clearing) dilakukan dengan mencelupkan dalam xylol, I, II, III masing-masing 3 menit, lalu dilanjutkan dengan penutupan (mounting) menggunakan cover glass dengan perekat entellan® (Kiernan, 1990; Bancroft & Gamble, 2008). Hasil pewarnaan kemudian diamati dan didokumentasikan menggunakan mikroskop cahaya CH-21 (Olympus, Japan) yang dilengkapi dengan peralatan mikrofotografi Dinoeye (Dinolite, Taiwan).

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Kualitas oosit dan tingkat maturasi oosit disajikan dalam bentuk persentase dan dianalisis dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Duncan apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P<0.05$). Data mikroskopis jaringan ovarium pascapenyimpanan disajikan secara deskriptif.

HASIL

Jumlah dan kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium pascapenyimpanan ovarium pada suhu 4°C disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil Tabel 1 terdapat penurunan yang signifikan ($P<0.05$) jumlah oosit dengan *grade* A setelah hari kedua penyimpanan. Jumlah oosit dengan *grade* A dari ovarium yang disimpan selama 1 hari, masih mempunyai jumlah yang sama dengan kontrol ($P<0.05$). Perolehan oosit *grade* A semakin menurun setelah hari keempat penyimpanan dibandingkan hari kedua, dan ketiga ($P<0.05$). Seiring dengan penurunan jumlah oosit *grade* A, terjadi peningkatan jumlah oosit yang mengalami degenerasi yang dimulai pada hari ketiga pascapenyimpanan ovarium ($P<0.05$).

Persentase tingkat maturasi inti oosit domba yang disimpan pada waktu penyimpanan yang berbeda pascapenyimpanan 4°C disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, penyimpanan ovarium domba pada suhu 4°C mengalami pola yang sama dengan nilai kualitas oosit, terdapat penurunan yang signifikan ($P<0.05$) terhadap persentase tingkat pematangan inti yang

mencapai MII setelah penyimpanan hari kedua. Tingkat pematangan inti yang mencapai MII pada penyimpanan hari 1, mempunyai nilai yang tidak berbeda nyata dengan lama waktu penyimpanan dengan kontrol ($P<0.05$). Seiring dengan penurunan jumlah oosit yang mencapai MII, terjadi peningkatan jumlah oosit yang mengalami degenerasi pada hari ketiga dan keempat pascapenyimpanan ovarium ($P<0.05$).

Kajian Histologi Folikel Pascapenyimpanan Ovarium pada Suhu 4°C

Berdasarkan hasil pengamatan histologi ditemukan bahwa pada kelompok kontrol, folikel masih dalam keadaan intak dengan sitoplasma yang homogen dan sel granulosa tertata dan masih beraturan (Gambar 1A). satu hari atau 24 jam setelah penyimpanan ovarium, kondisi folikel dan sel yang mengelilinginya masih sama dengan kelompok kontrol dengan oosit yang belum mengalami piknosis (1B). Terjadi perubahan morfologi pada folikel yang ditandai dengan adanya sitoplasma yang tidak homogen dan oosit mengalami koagulasi sedangkan sel granulosa masih tertata dan beraturan pada kelompok H2 atau 48 jam setelah penyimpanan ovarium (Gambar 1C). Tiga hari atau 72 jam setelah penyimpanan ovarium, folikel sudah tidak intak, oosit mengalami piknosis, sitoplasma kurang homogen, sel granulosa tidak beraturan dan membran sel ruptur (Gambar 1D). Demikian juga pada ovarium yang disimpan selama 4 hari atau 96 jam dimana ditemukan folikel yang tidak intak, oosit mengalami piknosis dan mengerut, sitoplasma kurang homogen, sel granulosa tidak beraturan dan membran sel rupture (Gambar 1E).

Tabel 1 Kualitas oosit dari ovarium pascapenyimpanan pada suhu 4°C

| Perlakuan | Jumlah oosit | Kualitas Oosit (%) | | | |
|-----------|--------------|------------------------------|-----------------|-------------------|------------------------------|
| | | A | B | C | Degenerasi |
| H-0 | 252 | 35 (14.9 ± 3.2) ^a | 71 (26.5 ± 8.7) | 145 (57.9 ± 8.2) | 1 (0.5 ± 1.3) ^a |
| H-1 | 212 | 25 (12.1 ± 4.0) ^a | 47 (22.9 ± 4.5) | 137 (63.6 ± 7.2) | 3 (1.1 ± 1.8) ^a |
| H-2 | 288 | 20 (7.8 ± 4.7) ^b | 73 (25.0 ± 5.5) | 192 (66.4 ± 6.4) | 3 (0.6 ± 1.1) ^a |
| H-3 | 265 | 15 (5.6 ± 3.2) ^b | 58 (22.8 ± 6.7) | 168 (62.4 ± 6.7) | 24 (8.9 ± 3.4) ^b |
| H-4 | 325 | 4 (1.2 ± 2.1) ^c | 70 (21.9 ± 9.2) | 125 (66.0 ± 12.3) | 36 (10.7 ± 4.3) ^b |

Keterangan: H-0: Kontrol pada suhu 34-36°C, H-1: 24 jam pada suhu 4°C, H-2: 48 jam pada suhu 4°C, H-3: 72 jam pada suhu 4°C, H-4: 96 jam pada suhu 4°C. Superskrip yang berbeda (a,b,c) dalam kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata pada setiap perlakuan ($P<0.05$).

Tabel 2 Tingkat pematangan inti oosit domba *in vitro* pascapenyimpanan ovarium pada suhu 4°C

| Perlakuan | Jumlah oosit | Tingkat Pematangan Inti (%) | | | | | |
|-----------|--------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | GV | GVBD | MI | AI/II | MII | Deg. |
| H-0 | 104 | 13 (10.2 ± 8.6) | 9 (7.6 ± 6.8) ^a | 5 (2.7 ± 5.3) | 1 (2.7 ± 4.3) | 80 (79.4 ± 6.8) ^a | 2 (2.6 ± 5.0) ^a |
| H-1 | 72 | 5 (6.6 ± 6.7) | 11 (18.0 ± 21.1) ^a | 4 (4.3 ± 7.3) | 1 (0.1 ± 0.4) | 49 (67.0 ± 11.1) ^a | 0 (0.0) ^a |
| H-2 | 93 | 11 (14.8 ± 18.0) | 23 (22.0 ± 20.5) ^a | 13 (13.9 ± 8.7) | 0 (0.0) | 41 (44.2 ± 18.5) ^b | 2 (2.2 ± 5.4) ^a |
| H-3 | 73 | 5 (6.4 ± 8.14) | 36 (48.5 ± 11.9) ^b | 11 (14.9 ± 8.6) | 0 (0.0) | 13 (18.5 ± 11.1) ^c | 7 (10.5 ± 17.6) ^{ab} |
| H-4 | 74 | 9 (10.5 ± 14.1) | 29 (41.3 ± 15.5) ^b | 11 (15.8 ± 18.2) | 0 (0.0) | 8 (10.9 ± 12.3) ^c | 16 (20.2 ± 19.6) ^b |

Keterangan: H-0: Kontrol pada suhu 34-36°C, H-1: 24 jam pada suhu 4°C, H-2: 48 jam pada suhu 4°C, H-3: 72 jam pada suhu 4°C, H-4: 96 jam pada suhu 4°C, GV: *germinal vesicle*, MI: *metaphase I*, AI-TI: *anaphase I/telophase I*, MII: *metaphase II*. Superskrip yang berbeda (a,b,c) dalam kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata pada setiap perlakuan ($P < 0.05$)

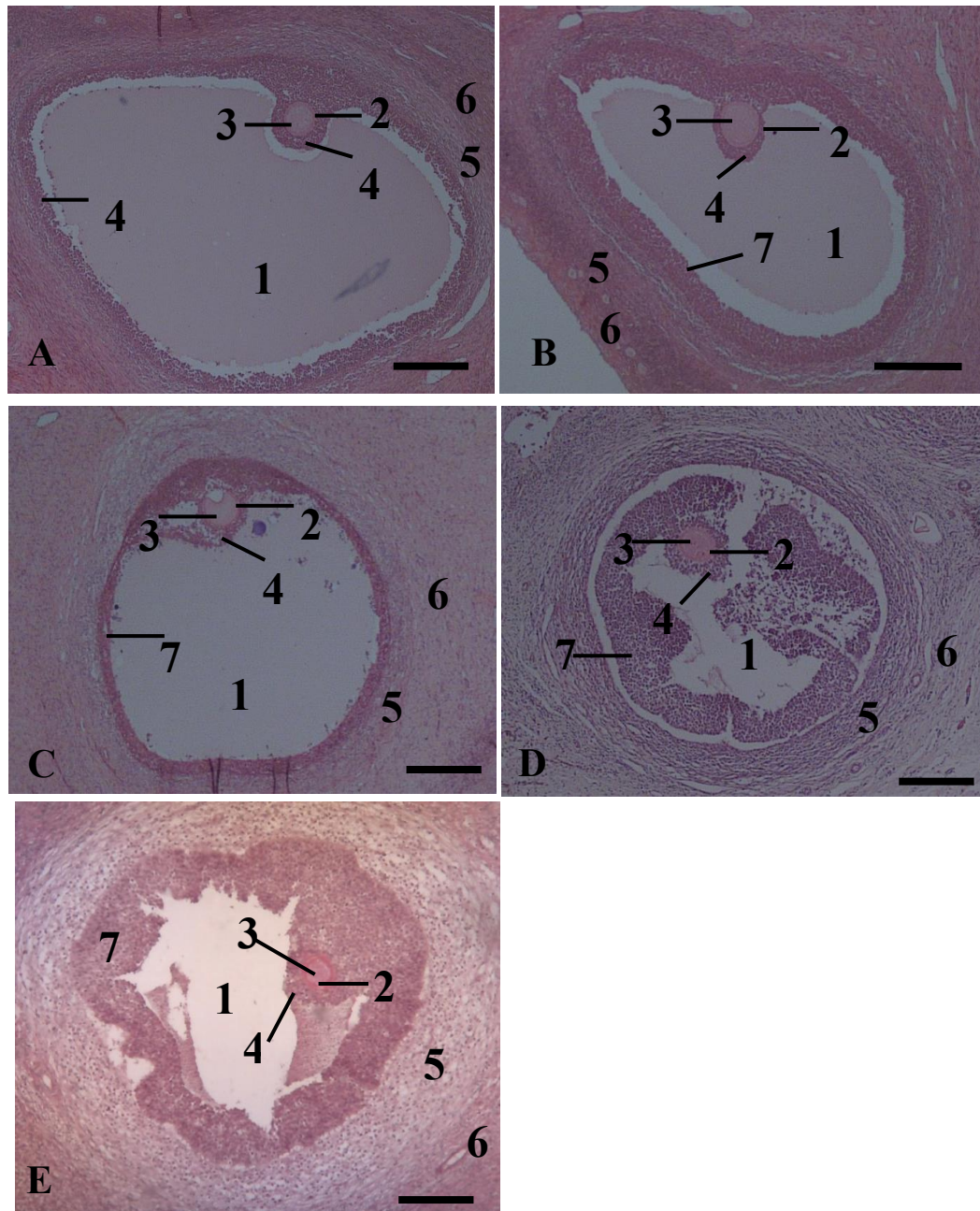
PEMBAHASAN

Kualitas oosit pada ovarium pascapenyimpanan 4°C menurun seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan, hal ini ditunjukkan dengan penurunan jumlah kualitas oosit A dan meningkatnya jumlah oosit yang berdegenerasi. Menurut Febretrisiana et al. (2015), lingkungan mikro yang baik untuk folikel yang spesifik dimana kondisi ini menyerupai kondisi normal di tubuh hewan yaitu dapat bertahan selama 4 jam setelah pembedahan. Setelah melebihi 8 jam penyimpanan, mengakibatkan penurunan kualitas oosit A dan B serta meningkatnya kualitas oosit D sejalan dengan lama penyimpanan pada ovarium. Penyimpanan ovarium lebih dari 4 jam mengakibatkan lingkungan mikro untuk oosit tidak mampu mendukung kebutuhan sel-sel jaringan untuk mencukupi kebutuhan nutrisi sel yang mengakibatkan kondisi menjadi anaerob. Kondisi anaerob menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga mengakibatkan perubahan ion-ion intraseluler. Kondisi tersebut akan diikuti dengan meningkatnya pH dan osmolaritas. Kondisi ini mengakibatkan sel-sel oosit mengalami degenerasi (Carvalho et al., 2001).

Kualitas oosit diklasifikasikan berdasarkan jumlah lapisan sel kumulus yang mengelilingi oosit. Jumlah lapisan kumulus yang mengelilingi oosit mengalami penurunan selama penyimpanan sehingga memengaruhi jumlah oosit yang mencapai fase metafase II. Davachi et al. (2011) melaporkan bahwa jumlah lapisan sel kumulus yang mengelilingi oosit (3-5 lapis) berpengaruh nyata terhadap jumlah oosit mencapai tahap MII. Pada kajian histologi folikel pada penelitian ini ditemukan jumlah lapisan sel

granulosa atau jumlah lapisan kumulus oosit mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan ditandai dengan menurunnya kerapatan sel pada sel granulosa. Sumarmin (2005) menyatakan bahwa ovarium setelah penyimpanan, umumnya mengalami kerusakan pada lapisan epitel, dimana hubungan antar sel pada korteks dan medulla ovarium mulai berdegenerasi mengakibatkan jarak antar sel semakin melebar. Carvalho et al. (2001) menambahkan bahwa jenis degenerasi folikel, selain menunjukkan *pycnosis*, oosit juga menunjukkan sel-sel granulosa tidak teratur dan menurunnya kepadatan tingkat seluler. Dari data tersebut di atas mengindikasikan bahwa kekompakan sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit diperlukan sebagai jalur transportasi nutrisi dari lingkungan eksternal oosit.

Menurunnya kemampuan oosit berkembang untuk mencapai MII pada beberapa hari penyimpanan mengindikasikan adanya kerusakan dan kematian pada sel, hal ini didukung dengan meningkatnya sel degenerasi dan meningkatnya jumlah oosit yang mengalami fase GVBD sejalan dengan lamanya hari penyimpanan pada ovarium. Keberhasilan oosit untuk mencapai tahap pembelahan meiosis sangat dipengaruhi oleh terbungkusnya mikrotubulus dan mikrofilamen setelah GVBD terbentuk, sejalan dengan berlangsungnya proses tersebut maka kebutuhan oksigen oosit akan meningkat (Yulnawati, 2006). Suhu transportasi dan penyimpanan media merupakan faktor utama yang mempengaruhi pematangan oosit lengkap (Tas et al., 2006). Selama transportasi ovarium, aliran darah ke ovarium akan



Gambar 1 Fotomikrograf folikel dalam ovarium domba yang disimpan pada suhu 4°C selama 0 jam atau kontrol (A), 24 jam (B), 48 jam (C), 72 jam (D) dan 96 jam (E). 1. Antrum, 2. Zona pellucida, 3. Oocyte, 4. Cumulus oophorus, 5. Theca interna, 6. Theca externa, 7. Granulosa cells. Bar skala 30 µm

berhenti, dan oosit dalam folikel menjalani kondisi iskemik (Wang *et al.*, 2011). Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa kondisi iskemik dapat mengakibatkan berbagai perubahan negatif dalam folikel, termasuk kekurangan oksigen, akumulasi metabolin, penurunan konsentrasi glukosa dan peningkatan indeks apoptosis pada sel granulosa (Pedersen *et al.*, 2004; Wongsrikeao *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2006). Jennings *et al.* (1975) menyatakan bahwa perubahan dalam

permeabilitas membran sel, yang disebabkan oleh kekurangan oksigen, menyebabkan perubahan pada tingkat intraseluler Na^+ , K^+ , dan Cl^- , yang terkait dengan perubahan dalam distribusi Ca^{2+} dan peningkatan air intraseluler. Hal ini dapat menyebabkan volume sel meningkat dan akibatnya terjadi degenerasi seluler.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa lama penyimpanan mengindikasikan adanya penurunan kualitas oosit dan penurunan persentase

tingkat maturasi inti oosit mencapai MII setelah penyimpanan 24 jam serta terjadi peningkatan persentase oosit yang mengalami degenerasi. Terjadi perubahan struktur sel dan degenerasi dari oosit pada gambaran histologi ovarium

UCAPAN TERIMA KASIH

Studi dan penelitian ini dibiayai dari beasiswa DIKTI melalui program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana dalam Negeri (BPPDN) Tahun 2013.

"Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak terkait dalam penelitian ini".

DAFTAR PUSTAKA

- Aman RR, Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biology Reproduction* 50:103-110.
- Bancroft JD, Gamble M. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Churchill Livingstone: Elsevier.
- Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, Bão SN, Figueiredo JR. 2001. Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Animal Reproduction Science* 66 :195-208.
- Chohan KR, Hunter AG. 2003. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation. *Animal Reproduction Science* 76(1):43-51.
- Davachi D, Kohram H, Zainoaldini S. 2011. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research* 102(1):37-42.
- Evecen M, Cirit U, Demir K, Karaman E, Hamzaoglu AI, Bakirer G. 2009. Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4 degrees C temperature. *Animal Reproduction Science* 116(1-2):169-72.
- Febretrisiana A, Setiadi MA, Karja NWK. 2015. Nuclear maturation of sheep oocytes in vitro: effect of storage duration and ovary temperature. *J. Indonesian Tropical Animal Agricultur* 40: 93-99.
- Ferreira M, Brasil A, Silva J, Andrade E, Rodrigues A, Figueiredo J. 2001. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. *Theriogenology* 55(8):1607-1617.
- Gordon I. 2003. *Laboratory of Cattle Production*: 2nd edition. London (GB): CABI publishing.
- Hanna C, Long, Hinricchs K, Westhusin M, Kraemer D. 2008. Assessment of canine oocyte viability after transportation and storage under different conditions *Animal Reproduction Science* 105 (3-4):451-6.
- Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. 1975. Ischemic tissue injury. *The American journal of pathology* 81(1):179.
- Karja NWK, Fahrudin M, Setiadi MA. 2013. In vitro fertility of post thawed epididymal ram spermatozoa after storage at 5 °C before cryopreservation. *Media Peternakan* 36: 26-31.
- Kiernan JA. 1990. *Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice*. 2nded. Oxford: Pergamon Press.
- Luu VV, Namula Z, Do LTK, Sato Y, Taniguchi M, Karja NWK, Otoi T. 2014. Nuclear Status and DNA Fragmentation of Oocytes from Porcine, Bovine and feline Ovaries Stored at 4°C for 5 Day. *CryoLetters* 3(1):48-53.
- Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science* 84(3-4):293-301.
- Moor RM, Crosby IM. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation, *Jurnal Reproduction Fertility* 75:467-473.
- Naoi H, Otoi T, Shimamura T, Karja NWK, Agung B, Shimizu R, Taniguchi M, Nagai T. 2007. Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. *Jurnal Reproduction Development* 53:271-277.
- Özdas ÖB, Baran A, Tas M, Cirit Ü, Demir K, Bacinoglu S, Pabuccuoglu S, Ak K. 2013. Effect of different transport temperatures on in vitro maturation of oocytes collected from frozen-thawed sheep ovaries. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 37(1):15-19.
- Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE. 2004. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology* 62(3-4):468-480.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, J. Currie J. 1990. Transient cooling to room

- temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 54:102–108.
- Safitri NA, Karja NWK, Setiadi MA, Fahrudin M. 2017. Daya fertilisasi spermatozoa kauda epididimis domba dengan atau tanpa swim up sebelum fertilisasi. *Acta Veterinaria Indonesiana* 5:1-7.
- Sakamoto A, Iwata H, Sato H, Hayashi T, Kuwayama T, Monji Y. 2006. Effect of modification of ovary preservation solution by adding glucose on the maturation and development of pig oocytes after prolonged storage. *Journal of Reproduction and Development* 52(5):669-674.
- Silva J, Lucci C, Carvalho F, Báo S, Costa S, Santos R, Figueiredo J. 2000. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. *Theriogenology* 54(5):809-822.
- Sumarmin R, Boediono A, Winarto A, Yusuf TL. 2005. Histologi Ovarium Domba Pascatransplantasi Intrauterin pada Kelinci Pseudopregnansi. *Animal Production* 10(2) : 17 - 84.
- Swanson WF. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* 66:49-58.
- Tas M, Evecen M, Ozdas OB, Cirit U, Demir K, Birler S, Pabuccuoglu S. 2006. Effect of transport and storage temperature of ovaries on in vitro maturation of bitch oocytes. *Animal Reproduction Science* 96(1-2):30-4.
- Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX, Xiong XR, Wang LJ, Liu J, Quan FS, Hua S, Zhang Y. 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 124(1-2):48-54.
- Wolfe BA, Wildt DE. 1996. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *Jurnal of Reproduction and Fertility* 106:135–41.
- Wongsrikeao PO, Takeshige Karja, Ni Wayan Kurniani Agung, Budiyanto Nii, Masahiro Nagai, Takashi. 2005. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 51(1):87-97.
- Yulnawati. 2006. Optimalisasi produksi embrio domba secara in vitro: penggunaan medium CR1aa dan pengaruh status reproduksi ovarium [Tesis]. Bogor (ID):Institut Pertanian Bogor.